На правах рукописи

Немихин Василий Васильевич

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОДЕИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Томск – 2018

Работа выполнена на кафедре органической и аналитической химии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Качин Сергей Васильевич

Официальные оппоненты: **Вершинин Вячеслав Исаакович**,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского», кафедра аналитической химии, профессор

Гавриленко Наталия Айратовна,
кандидат химических наук, доцент,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», кафедра аналитической химии, доцент

Ведущая организация: Институт химии и химической технологии ФГБНУ «ФИЦ КНЦ СО РАН» (г. Красноярск)

Защита состоится «10» октября 2018 г. в 14 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а, 2-й корпус, Малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634034, г. Томск, ул. Белинского, 53а и на сайте: http://portal.tpu.ru/council/911/worklist.

Автореферат разослан « »_____2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.269.04 Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Кодеин – 3-метилморфин, алкалоид опия, обладает умеренной анальгетической активностью, в связи с чем используется как компонент болеутоляющих лекарств, а также в качестве противокашлевого лекарственного средства центрального действия в сочетании с другими препаратами. Кодеин включен в Примерный перечень основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, Государственный реестр лекарственных препаратов Российской Федерации и в настоящее время является одним из наиболее широко используемых опиатов в мире. Однако, как и другие болеутоляющие средства на основе опиатов, при хроническом использовании кодеин может вызывать физическую зависимость, и поэтому также включен в Список II Перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации.

Кроме того, из кодеинсодержащих лекарственных препаратов кустарным способом нелегально синтезируют опиоидный анальгетик дезоморфин (сленговое название – «крокодил»), обладающий мощным наркотическим действием и оказывающий выраженное токсическое воздействие на организм человека. Это явилось одной из причин ужесточения порядка отпуска препаратов, содержащих кодеин, физическим лицам в аптечной сети.

Необходимость определения кодеина в различных объектах возникает при проверке подлинности лекарственных препаратов, терапевтическом мониторинге, тестировании лиц на употребление наркотических средств, а также при проведении судебно-химических исследований для подтверждения диагноза отравления препаратами опийной группы.

Сложный состав данных объектов и зачастую низкие концентрации кодеина в них предполагают использование для его определения высокочувствительных и селективных методов анализа. Наиболее эффективными и распространенными методами определения кодеина являются хроматографические. Причем, в зависимости от целей исследования используются как относительно сложные (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС), так и более простые (ТСХ) методы.

Вместе с тем, для определения кодеина представляют интерес методы молекулярной спектрометрии, сочетающие высокую чувствительность и экспрессность определения и, вместе с тем, не требующие сложного аппаратурного оформления и высокой квалификации оператора. Однако их применение для анализа кодеинсодержащих объектов весьма ограниченно, а существующие немногочисленные методики недостаточно чувствительны для определения низких содержаний кодеина.

Цель работы заключалась в разработке молекулярно-спектрометрических методик определения кодеина в лекарственных препаратах, биологических жидкостях и внутренних органах человека.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить спектроскопические характеристики кодеина.

2. Найти оптимальные условия определения кодеина методами люминесценции и спектроскопии диффузного отражения.

3. Предложить схемы пробоподготовки исследуемых объектов для выделения кодеина и минимизации мешающего влияния сопутствующих компонентов при его последующем определении.

4. На основании полученных данных разработать аналитические процедуры молекулярно-спектрометрического определения кодеина.

5. Оценить метрологические характеристики разработанных аналитических процедур определения кодеина при анализе реальных образцов.

Научная новизна. Впервые систематически изучены спектроскопические свойства кодеина в зависимости от pH среды, природы кислоты, органического растворителя, флуоресцирующего противоиона.

Найдены оптимальные условия определения микро- и нанограммовых содержаний кодеина методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения.

Предложены схемы пробоподготовки, позволяющие достичь заданной чувствительности и селективности определения кодеина в исследуемых объектах.

Разработаны новые подходы к молекулярно-спектрометрическому определению кодеина в растворах и твердой фазе.

Научная новизна полученных результатов подтверждена двумя патентами РФ на изобретения: патент № 2523408 «Способ определения кодеина», патент № 2621474 «Способ определения кодеина».

Практическая значимость. Разработаны молекулярно-спектрометрические методики определения кодеина в лекарственных препаратах (от 0,04 до 1,2 г/дм^3), во внутренних органах человека (от 0,01 до 0,75 мг/г), в моче человека (от 30 до 320 мкг/дм^3).

Методики успешно апробированы на реальных экспертных образцах и используются в работе Красноярского краевого бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» при проведении соответствующих судебно-химических исследований.

Полученные результаты используются на кафедре органической и аналитической химии Института цветных металлов и материаловедения Сибирского федерального университета при подготовке магистров по программе «Химия окружающей среды, химическая экспертиза и экологическая безопасность».

Основные положения, выносимые на защиту:

- спектроскопические свойства кодеина;
- оптимальные условия определения кодеина методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения;
- условия пробоподготовки исследуемых объектов;
- комплекс молекулярно-спектрометрических методик определения кодеина в лекарственных препаратах, внутренних органах и моче человека;
- результаты апробации разработанных методик определения кодеина в реальных образцах.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на V Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2011), IX научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 2012), VI Международной научно-практической

конференции «Достижения вузовской науки» (Новосибирск, 2013), XXV Международной научно-практической конференции «Наука и современность» (Новосибирск, 2013), VII Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 5 тезисов докладов в сборниках российских, международных конференций и симпозиумов, 2 патента РФ на изобретения.

Личное участие автора. Автор самостоятельно осуществлял поиск и систематизацию литературных данных. Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Обсуждение полученных результатов, их представление на конференциях, симпозиумах и подготовка материалов к публикации проводилась совместно с научным руководителем и соавторами.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, главы литературного обзора, трех глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (143 библиографические ссылки) и приложения. Диссертация изложена на 123 страницах, включает 41 рисунок и 28 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты исследования, приборы, реактивы и техника эксперимента

В качестве основного объекта исследования использовали соль кодеина фосфата (рис. 1) с чистотой 98% («Фармалаб», Австралия). Исходные растворы кодеина, парацетамола, пропифеназона, анальгина, кофеина (10 г/дм^3) готовили растворением точных навесок препаратов в 96%-ном этаноле.

Для исследования были выбраны кодеинсодержащие лекарственные препараты: «Пенталгин Плюс», «Пенталгин Н» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», г. Курск, Россия); «Седальгин-Нео» («Балканфарма-Дупница АД», г. Дупница, Болгария).

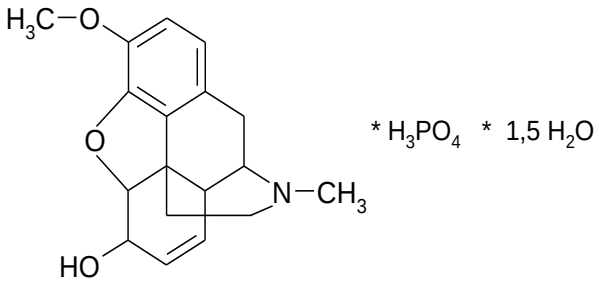

Рисунок 1. Структурная формула кодеина фосфата

В качестве биологических объектов использовали образцы печени, стенки желудка, мочи, предоставленные Красноярским государственным бюджетным учреждением здравоохранения «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (КГБУЗ «ККБСМЭ»).

Спектролюминесцентные исследования проводили с использованием спектрофлуориметров «Флюорат-02 Панорама» (ООО «Люмэкс», Россия) и «Cary Eclipse» («Varian», Австралия).

Для изучения люминесценции кодеина (парацетамола, пропифеназона, анальгина, кофеина) соответствующие аликвотные части исходных этанольных растворов выпаривали досуха и полученные сухие остатки растворяли в 0,05 М H_2SO_4 или 0,1 М HCl.

Для экстракционно-флуориметрического определения кодеина в виде ионного ассоциата с эозином в качестве исходного раствора эозина использовали стандартный раствор «ГЕМСТАНДАРТ–Э–1» производства ООО «ГЕМСТАНДАРТ» (Россия). Рабочие растворы эозина с меньшими концентрациями готовили разбавлением исходного раствора деионизованной водой.

При определении относительного квантового выхода флуоресценции кодеина стандартный раствор бисульфата хинина готовили растворением в 0,5 М H_2SO_4 точной навески дополнительно очищенного перекристаллизацией коммерческого препарата фирмы «HAB» (Индия).

Органические растворители (хлороформ, четыреххлористый углерод, толуол, этанол, диэтиловый эфир, изопропанол) предварительно очищали перегонкой.

Спектрофотометрические исследования. Спектры поглощения и оптическую плотность растворов регистрировали на спектрофотометре «Lambda 35» (Perkin Elmer, США).

Коэффициент диффузного отражения (R) измеряли на спектроколориметре «Пульсар» (ОКБА НПО «Химавтоматика», Узбекистан).

Хроматографические исследования. ТСХ процедуры проводили на пластинках Sorbfil ПТСХ-П-А, 10×15 см (Лабтех, Россия) с использованием смеси растворителей ацетон-хлороформ-25%-ый раствор аммиака (24:12:1). Для проявления хроматографической зоны кодеина применяли реактив Драгендорфа, который готовили по методике [Крамаренко, В.Ф. Токсикологическая химия, 1989].

ВЭЖХ-УФД измерения проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия).

Для ГХ-МС измерений использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 6890N (США) с автосамплером Agilent Technologies 7683B и квадрупольным детектором Agilent Technologies 5973 Network.

2. Изучение спектроскопических свойств кодеина

Люминесценция кодеина в водных растворах

Молекулярная форма кодеина в водных растворах не люминесцирует. Для активации свечения кодеина использовали 0,05 М H_2SO_4 и 0,1 М HCl. Для установления максимумов в спектрах возбуждения ($\lambda_{возб}$) и спектрах испускания люминесценции ($\lambda_{люм}$) были получены соответствующие трехмерные спектры растворов кодеина (рис. 2). Максимумы полос находятся: $\lambda_{возб}$ = 300 и $\lambda_{люм}$ = 345 нм. В этих условиях интенсивность люминесценции кодеина в H_2SO_4 примерно в 4 раза выше, чем в HCl, поэтому в дальнейших исследованиях использовали 0,05 М H_2SO_4.

С увеличением pH среды происходит незначительный гипсохромный сдвиг максимума в спектре люминесценции с 345 до 340 нм и уменьшение интенсивности свечения растворов кодеина (рис. 3).

Таким образом, оптимальными условиями проявления люминесцентных свойств кодеина являются: 0,05 М H_2SO_4; $\lambda_{возб}$ = 300 нм; $\lambda_{люм}$ = 345 нм.

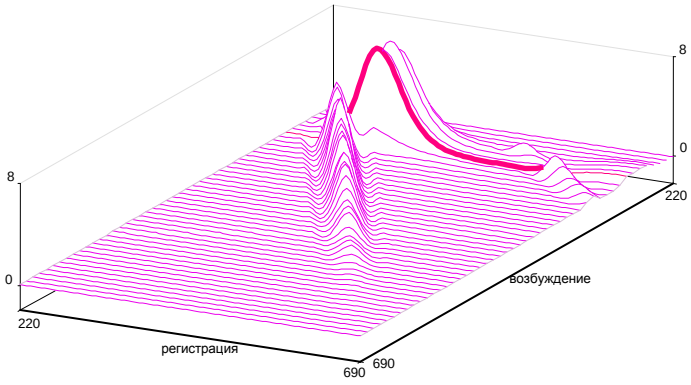

Рисунок 2. Трехмерный спектр люминесценции раствора кодеина ($C_{код}$ = 1 г/дм^3; 0,05 М H_2SO_4)

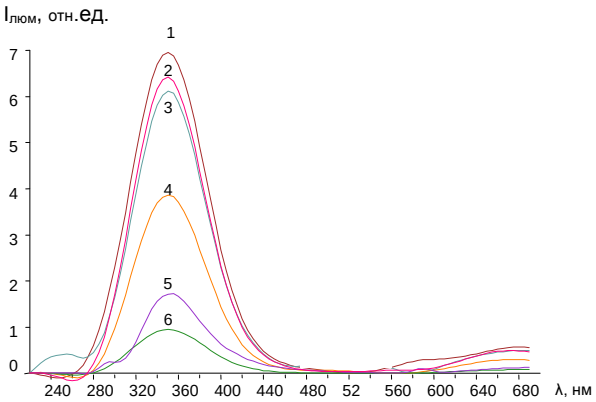

Рисунок 3. Спектры люминесценции растворов кодеина при различных pH среды ($\lambda_{возб}$ = 300 нм, $C_{код}$ = 1 г/дм^3): pH =1 (1), 4 (2), 7 (3), 9 (4), 11 (5) и 13 (6)

Определение относительного квантового выхода флуоресценции

Расчет относительного квантового выхода флуоресценции кодеина проводили с использованием в качестве стандартного флуоресцирующего вещества хинина бисульфата в 0,5 М H_2SO_4 с известным квантовым выходом флуоресценции ($\varphi_{фл}$ = 0,55). Рассчитывали относительный квантовый выход флуоресценции кодеина ($\varphi_{фл}$) по формуле (1):

$$\phi_{фл} = \frac{S_2 \times A_1}{S_1 \times A_2} \times 0{,}55, \quad (1)$$

где S_1, S_2 – площади под спектрами флуоресценции, а A_1, A_2 – оптические плотности растворов хинина бисульфата и кодеина соответственно.

Рассчитанный относительный квантовый выход флуоресценции кодеина составил 0,01.

Прямое люминесцентное определение кодеина в растворах. Относительно невысокий квантовый выход флуоресценции кодеина свидетельствует о том, что прямые люминесцентные определения возможны при значительных содержаниях последнего в растворах. Для выяснения концентрационного диапазона в найденных оптимальных условиях был построен градировочный график. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид y = 0,046x, а коэффициент корреляции равен 0,9989. Предел обнаружения кодеина,

рассчитанный по 3S-критерию, составил 3 мг/дм^3, а линейный диапазон определяемых содержаний 25 – 1000 мг/дм^3. Это определяет возможность прямого люминесцентного определения кодеина в объектах на уровне его микрограммовых содержаний, в частности, в лекарственных препаратах и внутренних органах человека. Вместе с тем, сложный состав указанных объектов требует предварительного выделения кодеина.

Экстракционно-флуориметрическое определение кодеина в растворах. Для определения нанограммовых содержаний кодеина использовали его свойство образовывать ионные ассоциаты, в данном случае, с люминесцентными реагентами, характеризующимися высокими относительными квантовыми выходами флуоресценции. Молекула кодеина содержит $=NCH_3$-группу с pK_a = 8,2, что обуславливает его нахождение в нейтральных и кислых водных растворах в виде слабо флуоресцирующего положительно заряженного иона. В качестве люминесцентного противоиона был выбран эозин ($\varphi_{фл}$ = 0,23), у которого значение pK_{a3} составляет 3,75. В слабокислых растворах эозин существует в виде двукратно диссоциированной формы, что является предпочтительным перед другими рассмотренными красителями для его использования в качестве противоиона в ионном ассоциате с кодеином (рис. 4).

Для повышения селективности определений была применена экстракция образующегося ионного ассоциата органическим растворителем. Установлено, что интенсивность флуоресценции экстракта ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле в 10 раз выше, чем в четыреххлористом углероде и в 3 раза – в хлороформе. При этом максимумы полос в спектрах возбуждения и спектрах испускания флуоресценции находятся при 520 и 550 нм соответственно.

На рис. 5 представлены нормированные спектры флуоресценции водных растворов кодеина, эозина и экстракта ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле. Как видно из рис. 5, при образовании ионного ассоциата наблюдается батохромное смещение максимумов спектров флуоресценции водных растворов кодеина (345 нм), эозина (540 нм) до 550 нм.

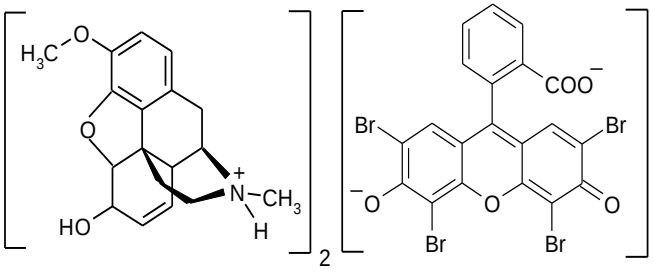

Рисунок 4. Ионный ассоциат кодеина с эозином

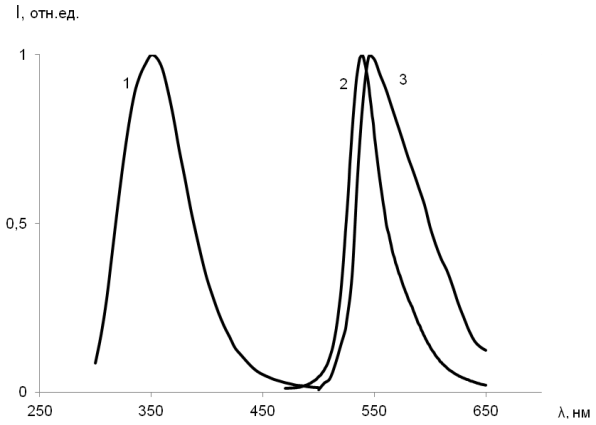

Рисунок 5. Нормированные спектры флуоресценции водных растворов кодеина (1), эозина (2), экстракта ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле (3)

Максимальная интенсивность флуоресценции ионного ассоциата наблюдается при его экстракции толуолом из водных растворов с pH 6-8 (рис. 6) и при 2-8 кратных избытках эозина (рис. 7). Интенсивность флуоресценции экстракта сохраняется в течение 24 часов.

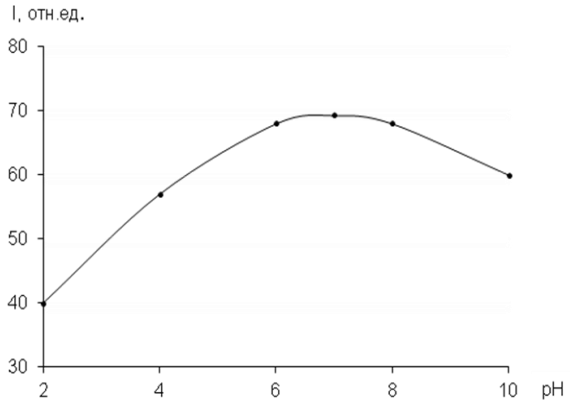

Рисунок 6. Зависимость интенсивности флуоресценции экстракта ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле от pH водного раствора ($C_{код} = C_{эоз} =$ 0,03 мг/дм^3, $\lambda_в$ = 520 нм)

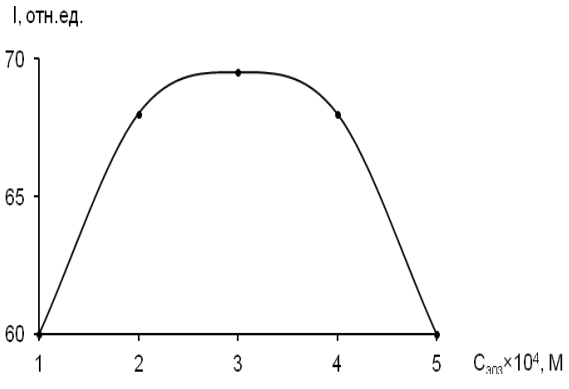

Рисунок 7. Зависимость интенсивности флуоресценции экстракта ионного ассоциата кодеина от концентрации эозина в водном растворе ($C_{код} = 1 \cdot 10^{-4}$ М, pH = 7, $\lambda_в$ = 520 нм)

В найденных оптимальных условиях градуировочный график (y = 11,547x; r = 0,9987) линеен в диапазоне 1,5 – 50 мкг/дм^3, а предел обнаружения кодеина составил 0,4 мкг/дм^3.

Твердофазная спектрометрия кодеина. Для отделения кодеина от мешающих компонентов широко используют ТСХ с последующим элюированием хроматографической зоны кодеина в раствор. Представляло интерес подобрать условия определения кодеина непосредственно в фазе сорбента методом спектрометрии диффузного отражения.

Для получения окрашенного соединения в фазе сорбента применяли реактив Драгендорфа (тетрайодовисмутат калия $K[BiI_4]$), который при взаимодействии с кодеином образует поверхностный ионный ассоциат (рис. 8) с характерной для него оранжевой окраской.

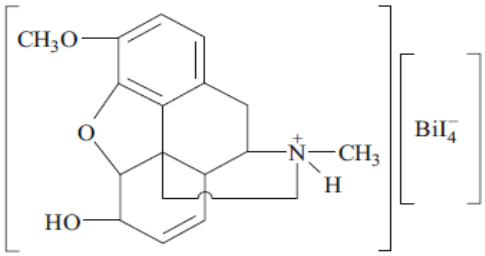

Рисунок 8. Ионный ассоциат кодеина с реактивом Драгендорфа

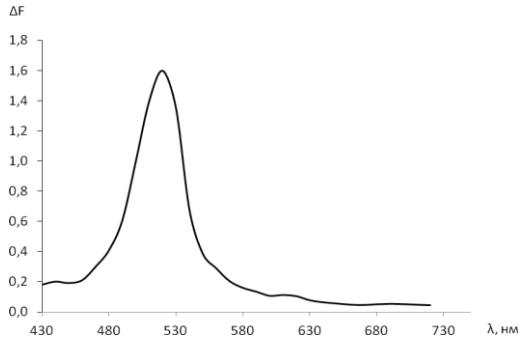

Рисунок 9. Спектр диффузного отражения поверхностного ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа

При этом интенсивность окраски пятна возрастает по мере увеличения концентрации кодеина в исходном растворе.

Спектр диффузного отражения поверхностного ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа в координатах функции Гуревича-Кубелки-Мунка (ΔF) от длины волны λ представляет собой широкую бесструктурную полосу с максимумом при 520 нм (рис. 9).

При концентрациях реактива Драгендорфа в диапазоне $1{,}2\cdot10^{-2}$ – $2{,}0\cdot10^{-2}$ М наблюдается максимальное и постоянное значение аналитического сигнала – ΔF (рис.10).

После завершения процедуры проявления зоны кодеина интенсивность окраски пятна и величина ΔF остается

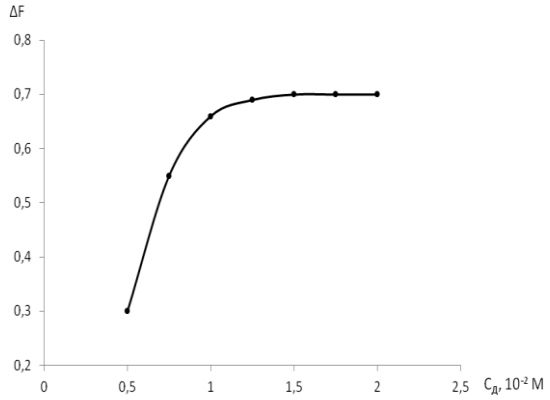

Рисунок 10. Зависимость ΔF от концентрации реактива Драгендорфа ($C_Д$), $C_{код}$=250 мг/дм^3

постоянной в течение 60 мин.

В найденных оптимальных условиях градуировочный график (y = 0,0028x; r = 0,9979) линеен в диапазоне 25 – 1000 мг/дм^3, а рассчитанный предел обнаружения кодеина составил 9 мг/дм^3.

3. Разработка и апробация методик молекулярно-спектрометрического определения кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах

В соответствии с полученными данными исследования спектроскопических свойств кодеина были разработаны методики определения кодеина в лекарственных препаратах, внутренних органах и моче человека.

3.1 Выделение кодеина из объектов исследования

Для выделения кодеина из объектов исследования использовали известные способы пробоподготовки, применяемые в экспертной практике, адаптированные к виду и условиям измерения аналитического сигнала, с целью минимизации мешающего влияния сопутствующих компонентов при последующем определении кодеина.

Лекарственные препараты. Для выделения кодеина использовали методику, предложенную авторами [Бушуев Е. С. Современные проблемы химико-токсикологического анализа наркотических средств и психотропных веществ, 2003]. Для этого таблетку (тб) лекарственного препарата тщательно измельчали в фарфоровой чашке, переносили в делительную воронку на 100 мл, растворяли в 10 мл 0,01 М HCl и выдерживали в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Далее экстрагировали диэтиловым эфиром трижды порциями по 10, 5, 5 мл в течение 15 мин. Объединенные так называемые «кислые» экстракты из

лекарственных препаратов, в соответствии со свойствами экстрагирующихся компонентов содержат фенобарбитал и напроксен.

Водный остаток подщелачивали 25%-ым раствором аммиака до pH 10 и экстрагировали хлороформом трижды порциями по 5 мл в течение 15 мин. Органические фазы фильтровали через бумажные фильтры (красная лента) и выпаривали досуха при комнатной температуре. «Щелочной» экстракт, содержит кодеин, анальгин, пропифеназон, парацетамол и кофеин. «Щелочной» экстракт использовали для определения кодеина.

Внутренние органы человека. Для выделения кодеина из образцов печени и стенки желудка использован метод А.А. Васильевой [Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия, 1989]. Навеску биоматериала (20 г) измельчали, тщательно перемешивали. К полученной пробе добавляли 40 мл 0,01 М раствора HCl и выдерживали 2 часа при периодическом перемешивании. Жидкую фазу отделяли центрифугированием (2500 об/мин) в течение 30 мин, а к твердой фазе добавляли 20 мл 0,01 М HCl и повторяли операции, описанные выше. Объединенные водные растворы трижды экстрагировали диэтиловым эфиром порциями по 20, 15, 15 мл в течение 15 минут. Эфирные экстракты отбрасывали («кислый» экстракт).

Водные растворы последовательно экстрагировали порциями по 15 мл смесью хлороформ – бутанол (9:1) при pH = 8, хлороформом (pH = 10), диэтиловым эфиром (pH = 13). Экстракты объединяли, фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») и упаривали досуха при комнатной температуре в чашках Петри. «Щелочной» экстракт растворяли в 5 мл хлороформа и использовали для определения кодеина.

Моча человека. Пробоподготовку образцов мочи человека проводили в соответствии с рекомендациями авторов [Мелентьев А. Б. Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических средств и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором для целей судебной токсикологии, 2001].

Для устранения мешающего влияния морфина (метаболит кодеина) использовали свойство кодеина экстрагироваться из слабо щелочных водных растворов диэтиловым эфиром. При этом морфин образует морфинат и остается в водной фазе. В пробирку вместимостью 20 мл вносили 10 мл мочи и 1 мл концентрированной HCl. Пробирку закрывали пробкой с металлическим фиксатором и подвергали кислотному гидролизу на глицериновой бане при температуре 100 ^{0}C в течение 30 минут. Раствор в пробирке охлаждали, добавляли 1,7 мл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали, выдерживали 10 минут, а затем фильтровали через бумажный фильтр «красная лента». Фильтр промывали 5 мл воды, подкисленной хлористоводородной кислотой до pH = 2. Фильтраты объединяли, переносили в делительную воронку и экстрагировали трижды по 5 мл смеси хлороформ - изопропанол (9:1) в течение 5 минут. Водный слой отделяли, нейтрализовали раствором гидрокарбоната натрия, добавляли 10%-ный раствор аммиака до pH = 8,5, экстрагировали дважды 5 мл диэтилового эфира в течение 5 минут. Органическую фазу отделяли, фильтровали через фильтр «белая лента» с безводным сульфатом натрия и выпаривали до сухого остатка («щелочной» экстракт) в токе теплого воздуха (60 ^{0}C).

3.2 Методики молекулярно-спектрометрического определения кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах

Методика люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах. Мешающее влияние сопутствующих компонентов после выделения кодеина в «щелочных экстрактах» устраняли ТСХ-разделением. При этом значения R_f составляли: кодеин (0,23), пропифеназон (0,60), анальгин (0,65), кофеин (0,66), парацетамол (0,71).

Схема методики прямого люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах показана на рис. 10, а соответствующий градуировочный график – на рис. 11.

Линейность градуировочного графика (y = 0,024x; r = 0,9972) сохраняется в диапазоне концентраций от 40 до 1200 мг/дм^3, а рассчитанный предел обнаружения составил 7 мг/дм^3.

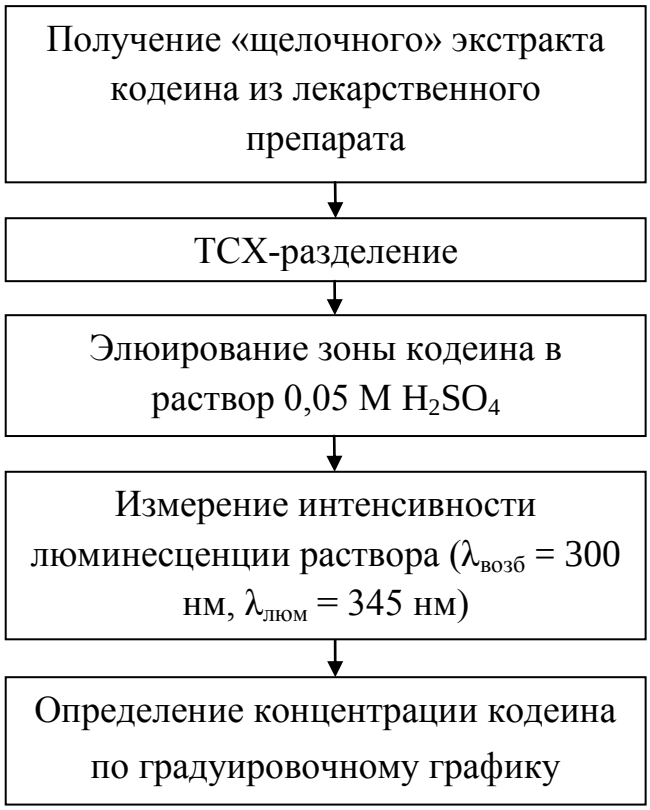

Рисунок 10. Схема методики люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах

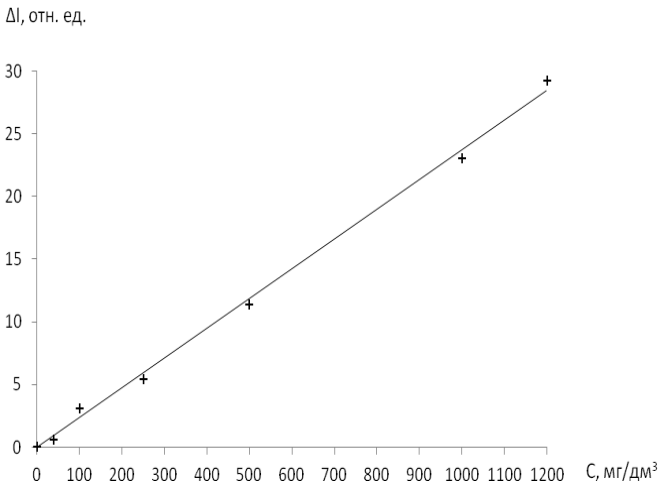

Рисунок 11. Градуировочный график люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах

Результаты апробации разработанной методики люминесцентного определения кодеина в некоторых лекарственных препаратах представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах (n = 5, P = 0,95)

Наименование препарата	Содержание кодеина, мг/тб		S	S_r
	Рецептурные данные	Найдено		
Пенталгин Плюс	8,0	8,3 ± 0,6	0,5	0,06
Пенталгин Н	8,0	8,4 ± 0,5	0,4	0,05
Седальгин-Нео	10,0	9,6 ± 0,5	0,4	0,04

Как видно из табл. 1, предлагаемая методика люминесцентного определения кодеина позволяет получать данные по содержанию кодеина в фармацевтических препаратах, сопоставимые с рецептурными данными.

Методика определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения.

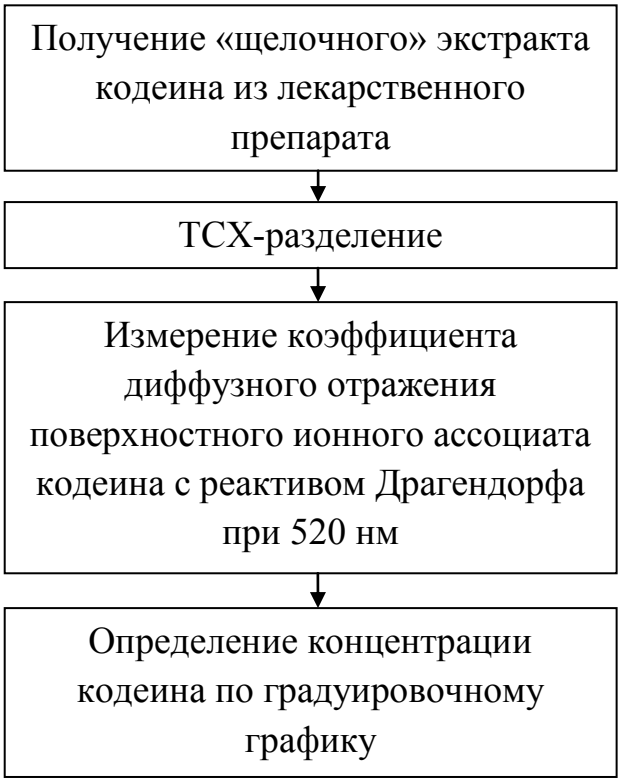

Рисунок 12. Схема методики определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения

Схема методики определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения представлена на рис. 12, а соответствующий градуировочный график – на рис. 13.

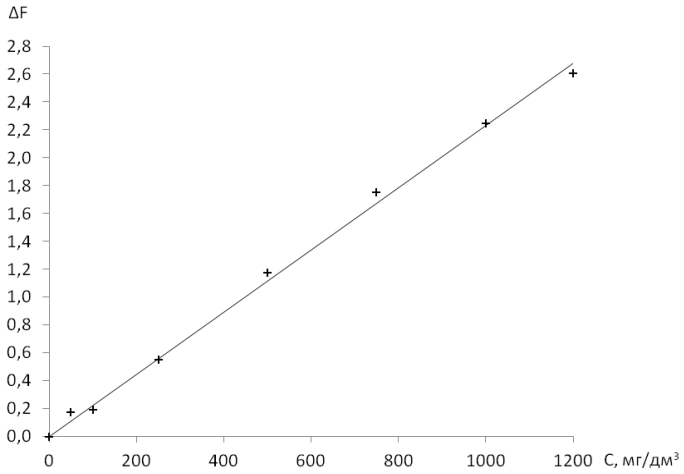

Рисунок 13. Градуировочный график определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения

Линейность градуировочного графика (y = 0,0022x; r = 0,9968) доказана в диапазоне концентраций от 50 до 1200 мг/дм^3, а рассчитанный предел обнаружения кодеина составил 15 мг/дм^3. В табл. 2 представлены результаты апробации разработанной методики на образцах лекарственных препаратов.

Таблица 2. Результаты определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения (n=5, P=0,95)

Наименование препарата	Содержание кодеина, мг/тб		S	S_r
	Рецептурные данные	Найдено		
Пенталгин Плюс	8,0	7,7 ± 0,5	0,4	0,05
Пенталгин Н	8,0	8,2 ± 0,5	0,4	0,05
Седальгин-Нео	10,0	10,2 ± 0,5	0,4	0,04

Как видно из табл. 2, были получены сопоставимые с рецептурными данными результаты, а измерение аналитического сигнала в твердой фазе позволяет значительно сократить время анализа.

Методика люминесцентного определения кодеина в органах человека. В судебно-химических исследованиях при подозрении на отравление неизвестным ядом, согласно приказу №346н от 12 мая 2010 г., судебно-медицинские эксперты наиболее часто исследуют печень и стенку желудка.

Основным мешающим компонентом для кодеина в данном случае является морфин. При ТСХ-разделении этих компонентов в «щелочном экстракте» значения R_f составили 0,23 и 0,09 соответственно.

Схема методики люминесцентного определения кодеина в органах человека представлена на рис. 14, а соответствующий градуировочный график – на рис. 15.

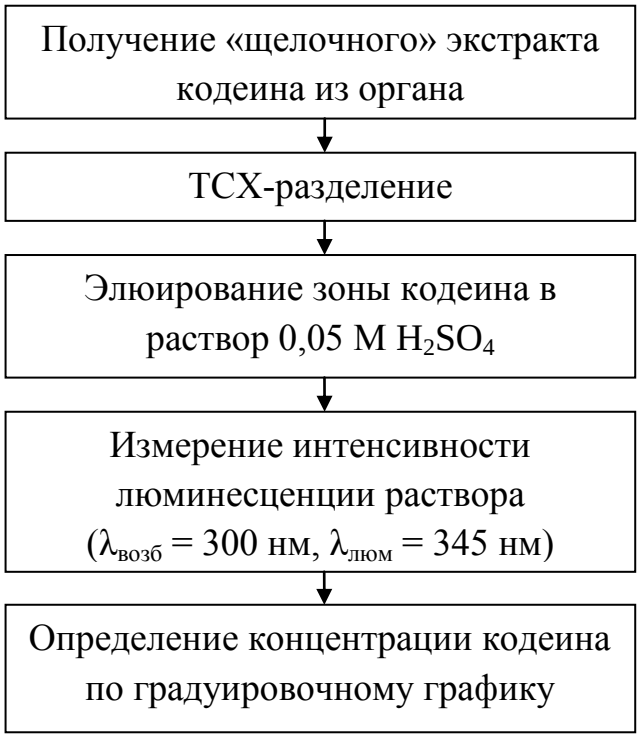

Рисунок 14. Схема методики люминесцентного определения кодеина в органах человека

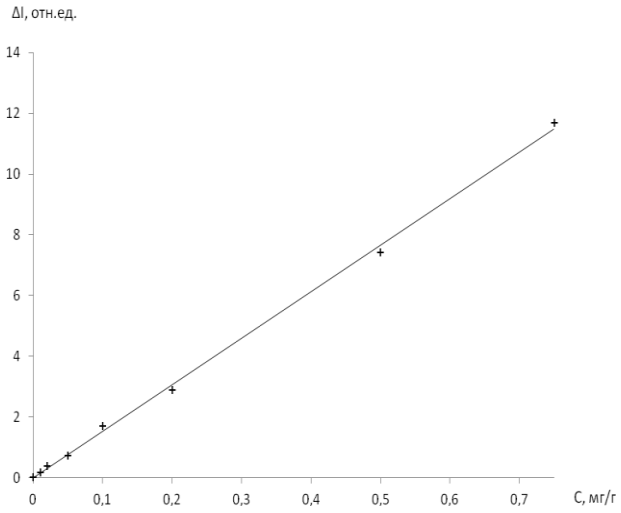

Рисунок 15. Градуировочный график люминесцентного определения кодеина в органах человека

Линейность градуировочного графика (y = 15,337x; r = 0,9988) сохраняется в диапазоне содержаний от 0,01 до 0,75 мг/г, а рассчитанный предел обнаружения составил $3 \cdot 10^{-3}$ мг/г.

Оценку правильности результатов люминесцентного определения кодеина в печени проводили методом «введено-найдено» (табл. 3). Для апробации был взят случай реального отравления кодеинсодержащими препаратами. В табл. 4 приведены сравнительные результаты определения кодеина методами люминесцентной спектроскопии ЛС и ВЭЖХ-УФ.

Таблица 3. Результаты определения кодеина люминесцентным методом в модельных образцах печени (n=5, P= 0,95)

Содержание кодеина, мг/г		S	S_r
Введено	Найдено		
0,050	0,046 ± 0,004	0,003	0,07
0,090	0,087 ± 0,005	0,005	0,05
0,30	0,29 ± 0,01	0,01	0,03
0,70	0,72 ± 0,05	0,04	0,06

Таблица 4. Результаты определения кодеина в экспертных образцах методами ЛС и ВЭЖХ (P=0,95; n=3)

Экспертный образец	Содержание кодеина, мг/г	
	Метод ЛС	Метод ВЭЖХ-УФ
Печень	0,040 ± 0,005	0,035 ± 0,005
Стенка желудка	0,133 ± 0,009	0,126 ± 0,012

Как видно из табл. 3, 4, результаты люминесцентного определения кодеина в органах человека характеризуются достаточной точностью и удовлетворительно совпадают с данными независимого ВЭЖХ метода.

Методика экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека. Концентрации кодеина в моче человека при проведении скрининговых исследований, подтверждающих его наличие при злоупотреблениях, составляют порядка $n \cdot 10^2$ мкг/дм^3.

Схема методики экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека представлена на рис. 16, а соответствующий градуировочный график – на рис. 17.

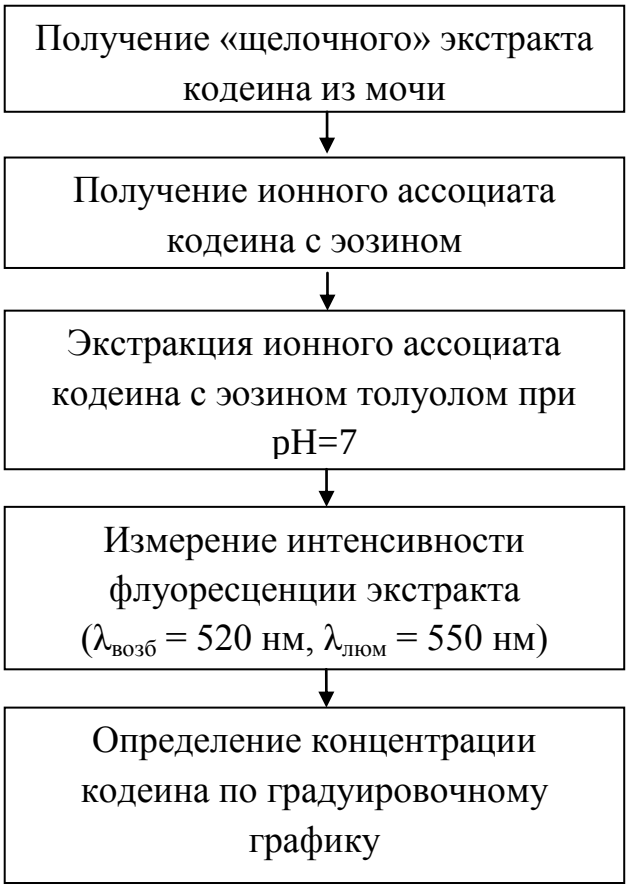

Рисунок 16. Схема методики экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека

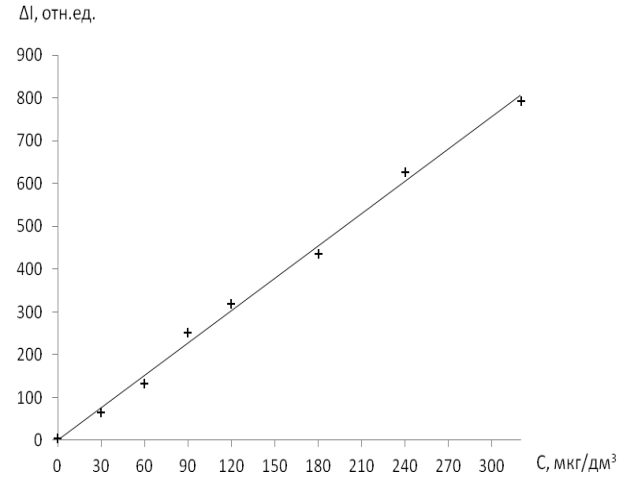

Рисунок 17. Градуировочный график экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче

Линейность градуировочного графика (y = 2,5228x; r = 0,9959) сохраняется в диапазоне концентраций от 30 до 320 мкг/дм^3, а рассчитанный предел обнаружения кодеина составил 6 мкг/дм^3.

Оценку правильности методики проводили методом «введено-найдено» в образцах мочи человека, не содержащих кодеина (табл. 5). В табл. 6 приведены сравнительные результаты определения кодеина экстракционно-флуориметрическим и независимым ГХ-МС методом в экспертных образцах мочи потребителей опиатов.

Как видно из табл. 5, 6, результаты экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека характеризуются правильностью, достаточно высокой воспроизводимостью и удовлетворительно совпадают с данными независимого ГХ-МС метода.

Таблица 5. Результаты определения кодеина экстракционно-флуориметрическим методом в модельных образцах мочи (n=5, P = 0,95)

Содержание кодеина, мкг/дм^3		S	S_r
Введено	Найдено		
50	47 ± 3	2,8	0,06
100	96 ± 6	4,8	0,05
150	156 ± 8	6,2	0,04
200	192 ± 9	7,7	0,04
250	262 ± 13	10,4	0,04
300	315 ± 20	15,8	0,05

Таблица 6. Результаты определения кодеина в экспертных образцах мочи человека экстракционно-флуориметрическим (Э/фл) и ГХ-МС–методами (n = 3; P = 0,95)

Экспертный образец (№)	Содержание кодеина, мкг/дм^3	
	Метод Э/фл	Метод ГХ-МС
1	120 ± 14	124 ± 11
2	248 ± 21	242 ± 17

Давая общую характеристику разработанным молекулярно-спектрометрическим методикам, следует отметить, что в известной нам литературе отсутствуют сведения об использовании методов люминесценции и спектроскопии диффузного отражения, равно как и соответствующих методик для определения кодеина в лекарственных препаратах, внутренних органах и моче человека. Учитывая достаточно высокую чувствительность, экономичность этих методов при относительной простоте инструментария, а также успешную апробацию разработанных аналитических процедур на реальных образцах, можно рассматривать последние в качестве дополнения к существующим методикам при решении определенных задач в практике учреждений соответствующего профиля. Таковыми могут быть, например, разовые анализы, априорная оценка содержания кодеина в исследуемых образцах перед проведением серийных весьма затратных ГХ-МС, ВЭЖХ, ГЖХ и других определений или отсутствие соответствующей приборной базы.

ВЫВОДЫ

1. Изучены спектроскопические свойства кодеина в растворах и твердой фазе. Оптимальными условиями люминесценции кодеина в водных растворах являются: 0,05 М H_2SO_4; $\lambda_{возб}$ = 300 нм; $\lambda_{люм}$ = 345 нм. Определен относительный квантовый флуоресценции кодеина в водных растворах, который составил 0,01.

Впервые изучены условия образования, экстракции и флуоресценция кодеина в виде его ионного ассоциата с эозином (pH = 6 - 8; $C_{эоз}$ = $1•10^{-5}$ - $1•10^{-3}$ М; органическая фаза толуол; $\lambda_{возб}$ = 520 нм; $\lambda_{люм}$ = 550 нм). Найдены условия количественного определения кодеина в виде его ионного ассоциата с реактивом Драгендорфа в фазе сорбента путем измерения коэффициента диффузного отражения при λ = 520 нм.

2. В найденных оптимальных условиях установлена возможность определения кодеина методами люминесценции (в растворах) и спектрометрии диффузного отражения (в твердой фазе). Пределы обнаружения кодеина составляют 3 мг/дм^3 и 9 мг/дм^3 соответственно. Для определения низких содержаний кодеина в растворах предложено использовать флуоресценцию экстракта его ионного ассоциата с эозином в толуоле. Предел обнаружения кодеина составляет 0,4 мкг/дм^3.

3. Предложены схемы пробоподготовки исследуемых объектов, адаптированные к виду и условиям измерения аналитического сигнала, для выделения кодеина и минимизации мешающего влияния сопутствующих компонентов при его последующем определении. Для лекарственных препаратов и внутренних органов человека использован метод ТСХ-разделения. Мешающее влияние компонентов при анализе мочи человека, в частности морфина, минимизировали процедурой экстракции кодеина диэтиловым эфиром.

4. Разработаны методики определения кодеина в лекарственных препаратах методами люминесценции (40 – 1200 мг/дм^3) и спектроскопии диффузного отражения (50 – 1200 мг/дм^3). Разработана люминесцентная методика определения кодеина во внутренних органах человека: печени, стенке желудка (0,01 – 0,75 мг/г). Разработана экстракционно-флуориметрическая методика определения кодеина в моче человека (30 – 320 мкг/дм^3). Относительные стандартные отклонения при проведении соответствующих измерений не превышают 0,07.

5. Разработанные методики успешно апробированы на реальных экспертных образцах лекарственных препаратов, внутренних органов и мочи человека.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Немихин, В.В. Изучение спектролюминесцентных свойств кодеина с целью его определения в некоторых лекарственных препаратах / **В.В. Немихин**, С.В. Качин, Т.С. Шахворостова // Журнал Сибирского Федерального университета. Химия. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 289-295.

2. Немихин, В.В. Люминесцентное определение кодеина в органах человека / **В.В. Немихин**, С.В. Качин, С.А. Сагалаков, Т.С. Шахворостова // Фундаментальные исследования. – 2013. - № 1, Ч. 2. – С. 483-486.

3. Немихин, В.В. Определение кодеина в лекарственных препаратах методом спектроскопии диффузного отражения / **В.В. Немихин**, С.В. Качин, С.И. Метелица, В.Н. Лосев, С.А. Сагалаков, Т.С. Шахворостова // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2016. – Т. 82, № 2. – С. 20-23.

4. Метелица, С.И. Экстракционно-флуориметрическое определение кодеина в моче человека / С.И. Метелица, Е.В. Киреева, **В.В. Немихин**, С.В. Качин, В.Н. Лосев, С.А. Сагалаков // Аналитика и контроль. – 2017. – Т. 21, № 4. – С. 315-321.

Материалы конференций:

5. Немихин, В.В. Изучение спектролюминесцентных свойств кодеина с целью его определения / **В.В. Немихин**, Т.С. Шахворостова, Р.В. Клемичев, С.А. Сагалаков // V Международный симпозиум «Химия и химическое образование»: сборник научных трудов. – Владивосток, 2011. – С. 116-117.

6. Немихин, В.В. Люминесцентное определение кодеина в некоторых лекарственных препаратах / **В.В. Немихин**, С.В. Качин, С.А. Сагалаков, Н.А. Козель // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: материалы IX научной конференции. – Красноярск, 2012. – С. 268.

7. Немихин, В.В. Изучение люминесцентных свойств кодеина / **В.В. Немихин** // Достижения вузовской науки: сборник материалов VI Международной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2013. – С. 158-163.

8. Немихин, В.В. Люминесцентное определение кодеина в присутствии кофеина, парацетамола и анальгина / **В.В. Немихин** // Наука и современность –

2013», часть 2: сборник материалов XXV Международной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2013. – С. 92-97.

9. Метелица, С.И. Экстракционно-флуориметрическое определение кодеина в моче человека / С.И. Метелица, **В.В. Немихин**, С.В. Качин, В.Н. Лосев, С.А. Сагалаков // VII Международный симпозиум «Химия и химическое образование»: сборник научных трудов. – Владивосток, 2017. – С. 85.

Патенты на изобретения РФ:

10. Способ определения кодеина: пат. 2523408 Рос. Федерация: МПК G 01 N 33/15, G 01 N 30/90 / **Немихин В.В.**, Качин С.В., Сагалаков С.А., Шахворостова Т.С., Метелица С.И., Лосев В.Н.; заявитель и патентообладатель Сибирский федеральный ун-т. – 2013121958/15; заявл. 13.05.2013; опубл. 20.07.2014, Бюл. №20.

11. Способ определения кодеина: пат. 2621474 Рос. Федерация: МПК G 01 N 21/64 / Метелица С.И., Киреева Е.В., **Немихин В.В.**, Качин С.В., Сагалаков С.А., Лосев В.Н.; заявители и патентообладатели Сибирский федеральный ун-т и КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» Сибирский. – 2016112825; заявл. 04.04.2016; опубл. 06.06.2017, Бюл. №16.

Автор выражает благодарность научному руководителю д.х.н., профессору кафедры органической и аналитической химии СФУ С.В. Качину за профессиональное интеллектуальное сопровождение исследований и обсуждение полученных результатов;

д.х.н., профессору, старшему научному сотруднику НИЧ СФУ В.Н. Лосеву за ценные консультации и предоставление экспериментальной базы Научно-исследовательского инженерного центра «Кристалл»;

к.х.н., инженеру-исследователю НИЧ СФУ С.И. Метелице за помощь в организации и проведении ряда экспериментов и интерпретации полученных результатов;

начальнику КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» А.В. Донскому и к.х.н., заведующему судебно-химического отделения

Г.А. Слащинину за предоставление возможности проведения исследований на базе судебно-химического отделения;

к.х.н., судебному эксперту-химику высшей квалификационной категории О.А. Дуковой и судебному эксперту-химику высшей квалификационной категории Т.С. Шахворостовой за консультации и участие в апробации разработанных методик, и оформлении результатов.